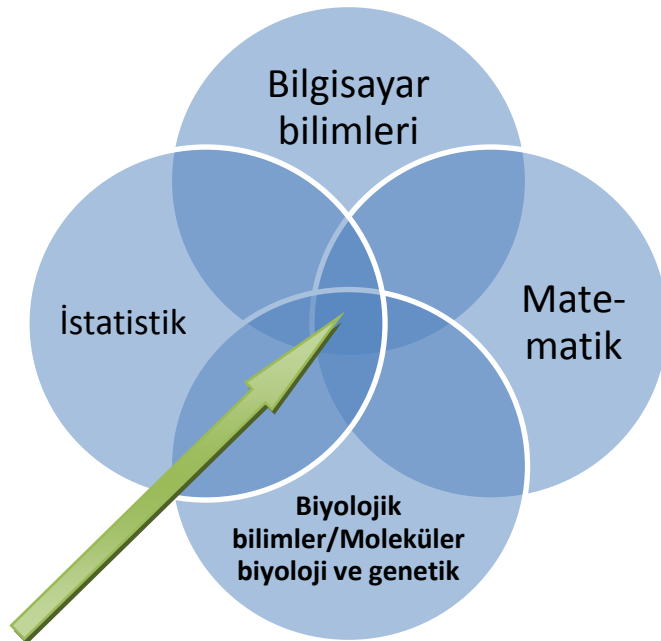
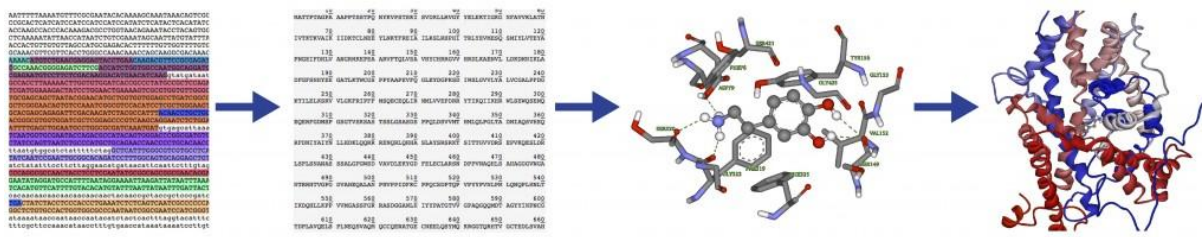


BIYOİNFORMATİK I DERSİ İÇİN BAZI NOTLAR

Dr. Naşit İĞÇİ

- Biyoloji
- İformatik/Enformatik (Informatics): Bilgi ve bilgisayar bilgi sistemleri ile ilgilenir. Bilgi işlenmesi, bilgi sistemlerinin mühendisliği
- **Biyoinformatik:** En kısa şekliyle biyolojik bilginin saklanacağı veri tabanlarının organize edilmesi ve bu bilginin bilgisayar yardımıyla incelenmesi ve işlenmesi olarak ifade edilebilir.
- **Hesaplamalı Biyoloji:** Canlılarla ilgili olayların çeşitli analiz yöntemleri, matematiksel modelleme ve bilgisayar simülasyonları ile modellenmesi. Biyolojik sistemlerin işleyişini anlamak gözlem gerektirdiği kadar hesaplama da gerektirir.
- Artan veriyle birlikte bilgisayarlar biyolojik bilimler çatısı altında yürütülen araştırmaların önemli bir parçası haline gelmiştir.



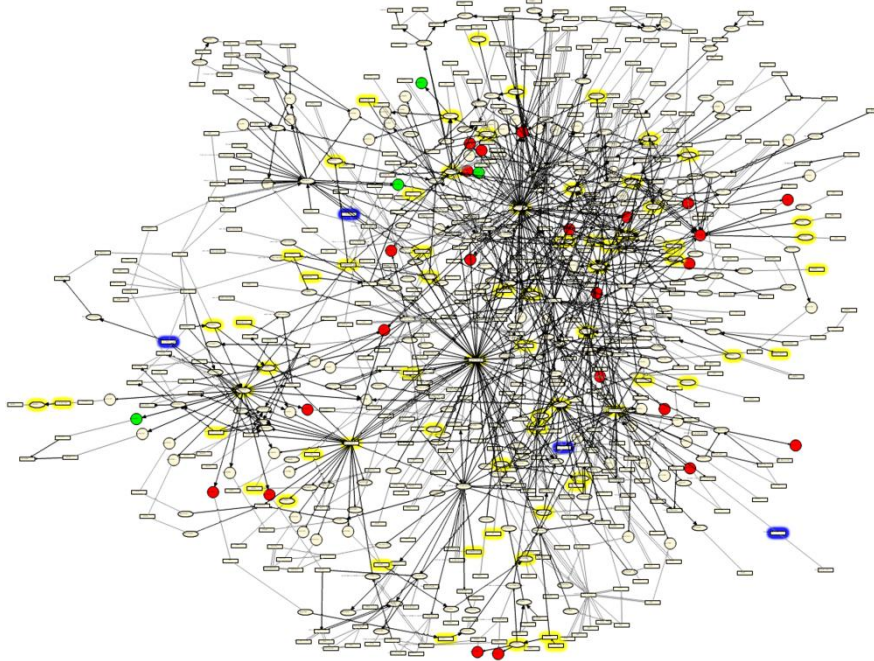
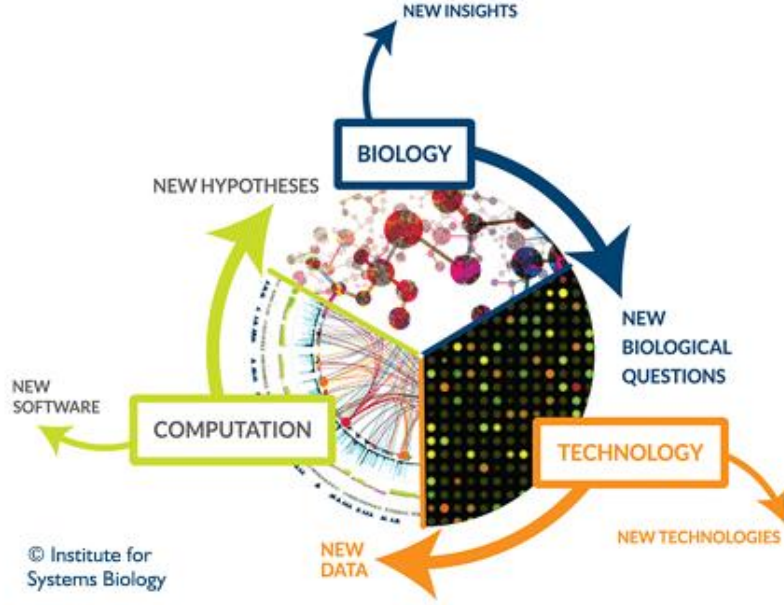
BIYOİNFORMATİK

- **In vivo**
- **In vitro**
- **In silico**
- Biyoinformatiğin çıkış noktasını ve aynı zamanda temel uygulama materyalini oluşturan biyolojik veri **DNA ve protein dizileridir.**
- Genom projeleri.
- İnsan genom projesi, biyoinformatik alanının da ayrı bir disiplin olarak oluşmasında önemli rol oynamıştır.

Biyoinformatik çalışmalara bazı örnekler

- Genom projelerinden elde edilen verinin düzenlenmesi
- Hastalıklara ait genlerin keşfedilmesi ve toplumdaki sıklığının belirlenmesi
- Hastalıkların altında yatan genetik temellerin araştırılması
- Bir DNA dizisinin hangi gene ve canlıya ait olduğunun bulunması
- Bir protein dizisinin hangi gene ve canlıya ait olduğunun bulunması
- Büyük ölçekli gen ifade analizleri
- Protein dizisinden 3 boyutlu yapı tahmini
- İlaç etkileşimlerinin araştırılması>Moleküler etkileşimler
- Yeni ilaçların keşfi (Bilgisayar destekli ilaç tasarımı)
- Karşılaştırmalı genomiks/proteomiks > Moleküler evrim, moleküler filogenetik
- Kütle spektrometresi ile protein tanımlama
- Biyolojik anlamlandırma: Anotasyon ve yolak analizleri
- Metastaz yapan kanser hücrelerinin modellenmesi
- Canlıların yaşam döngülerinin ve yayılışlarının modellenmesi (ekolojik modelleme)
- Meta-analizler
- Yeni Nesil Sekanslama veri analizleri
- Mikrodizi analizleri

SİSTEM BİYOLOJİSİ: Omiks teknolojiler sayesinde artan veri ile farklı seviyelerde bilgi edinip bütünü görmeye çalışarak biyolojik süreçleri çözümlemek.



- **Programlama dili**
- **Algoritma**
- Programlama dilini, insanların kullandığı dillere benzetebiliriz. Ancak aynı dili konuşursak anlaşabiliriz. Bilgisayara da bir şey anlatmak, istediğimiz bir şeyi yaptırabilmek için onlarla konuşmamız gerekir. Bu nedenle bilgisayar ile iletişime geçmek için en az bir programlama dilini bilmemiz gerekir.
- Algoritmaları ise, bu dili kullanarak kurduğumuz cümlelere benzetebiliriz. Bu cümlelerde ne yaptırmak istediğimizle ilgili yolları gösteririz.
- Veritabanları (Database)
- Veritabanları, internet çıkmadan önce de vardı. Lokal bilgisayarlarda depolanıyordu.
- Bunlardan önce de ciltler halinde kitaplar vardı (ör: amino asit dizilimlerini, DNA dizilimlerini içeren ciltler halinde kitaplar)

ÖNEMLİ TANIMLAR

Exon

Intron

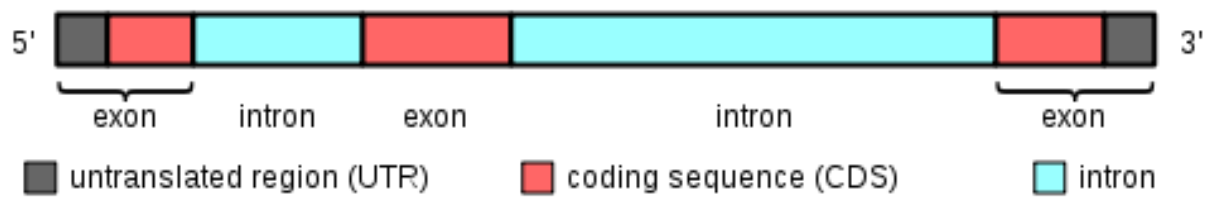
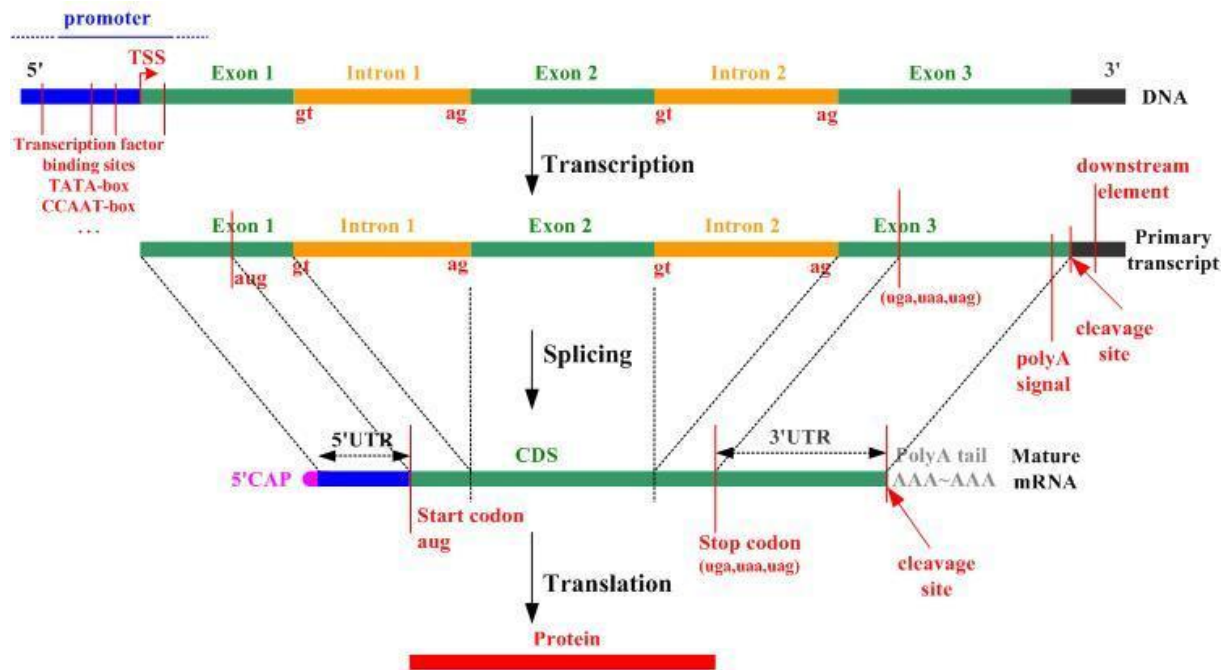
UTR (Untranslated region)

CDS (Coding sequence)

Flanking sequence (upstream, downstream)

Transcript variant

Polymorphism



PRİMER TASARLAMA: Primer Tasarımında Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar

1. Primerlerin uzunluğu

İdel bir primerde oligonükleotidlerin uzunluğu 18-24 baz arasında olmalı. (Daha az ve daha fazla uzunluğa sahip primerlerin tasarlandığı özel PCR uygulamaları da olabilir)

2. Primerlerin T_m değerleri

Primerlerin T_m değerlerinin 55-65 °C arasında olması idealdir. (Bu da 20 nt bir oligo için %45-55 GC oranına denk gelir)

Oligonükleotid çiftlerinin T_m 'leri birbirine denk veya yakın olmalı (Fark 5 °C'ye kadar kabul edilebilir ama ne kadar yakınsa o kadar iyidir).

Bağlanma (annealing) sıcaklığı (T_a) ise, genellikle T_m değerinin 4-5 °C altı olarak düşünülür ve PCR reaksiyonu buna göre planlanır. Ancak yine de PCR öncesinde bağlanma sıcaklığı için mutlaka optimizasyon çalışması yapılmalıdır. Çünkü bu hesaplanan değerler oligonükleotidlerin baz içeriklerine göre hesaplanmaktadır bu nedenle deneysel veri ile doğrulanmalıdır. T_m değerinin hesaplanmasında farklı yaklaşımlar vardır.

T_m değeri hesaplamaları için Oligo Calc uygulaması (ve benzeri diğer çeşitli uygulamalar) kullanılabilir.

<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>

Primer-BLAST uygulaması verdiği sonuçta T_m değerlerini de hesaplayıp göstermektedir.

3. Özgüllük

Oligonükleotidin tek bir dizilime özgül olması gerekmektedir. Özgüllükte esas rolü oligonükleotidin 3'ucu oynar. Yani primer 3' ucundan mutlaka iyi bir şekilde komplementer olmalı.

Burada primer çiftinin, çalışılan organizmanın genomu üzerinde başka yerlere bağlanıp PCR ürünü oluşturma ihtimali olup olmadığı da değerlendirilmelidir. Oluşma potansiyeli olan ürünler, özellikle kendi çoğaltacağımız bölgenin uzunluğuna da yakınsa PCR sonrası sorun oluşturur, istenmeyen diziler elde edilebilir. Bu nedenle primer çiftinin genomda başka bir yere bağlanıp ürün oluşturmaması istenmez. En ideali istenen bölgenin dışında hiçbir yere bağlanmamasıdır. Eğer elimizdeki alternatiflerin hepsi bağlanıyorsa bunun derecesine bakılır. Örneğin komplementerlik sadece primerin 5' ucu tarafında var ama 3' ucunda eşleşme yoksa sıkıntı oluşturmaz. Ayrıca primerler ayrı ayrı birbirine çok uzak bölgelere bağlanıyorsa bu da sıkıntı oluşturmaz. Bu analiz Primer-BLAST kullanılarak yapılabilir.

Ödevde "Max. Target size" 2000 olarak seçilebilir. (Bununla ilgili tartışma derste yapılmıştı)

4. Sa tokası (Hairpin) oluşturma

Eğer bir kimyasal reaksiyonun (oligonükleotitlerin sa tokası veya birbiriyle dimer oluşturması gibi) enerji değişimi (ΔG) değeri (-) ise ekzotermik bir reaksiyon (dışarıya enerji verir, çabuk ve kolay oluşur), enerji değişimi değeri (+) ise endotermik bir reaksiyon (dışarıdan enerji alır, yavaş ve zor oluşur, normal şartlarda gerçekleşmesi zordur) söz konusudur. PCR primerlerinin tasarlanmasında sa tokası ve dimer oluşumlarını değerlendirirken ideal olarak (+) ΔG değerleri istense de küçük/0'a yakın (-) ΔG değerleri de kabul edilebilir. Ancak bu değerin -7 kcal/mol den daha düşük olması istenmez (kesin bir kural değildir, tecrübeye dayanmaktadır, ideal olan + olması ya da - ise de sifıra yakın olmasıdır).

Sa tokası oluşurmaması için oligonükleotid kendi içinde karşılıklı eşlenik baz dizileri içermemeli. Sa tokası oluşumu özellikle 4 veya daha fazla bazın eşleşmesi ile oluşmuşsa bu durum istenmez.

Sa tokası oluşumunda eşleşen baz çiftleri A-T ise, G-C çiftlerine göre daha kolay birbirinden ayrılabilereği için daha kabul edilebilir olur (ancak hala eşleşme sayısı ve ΔG değeri açısından uygun olmalı).

Yapılan analizde oluşan sa tokası yapısı için T_m değeri de verilmektedir. Bu değer, PCR reaksiyonunda çıkılacak sıcaklıkların altındaysa, sa tokası yapısı PCR reaksiyonunda açılacaktır.

Sa tokası oluşturma tasarlanan primer çiftlerindeki her bir primer (f ve r) için tek tek yapılmalıdır.

Bu analiz IDT OligoAnalyzer Tool kullanılarak yapılabilir.

Aę adresi: <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>

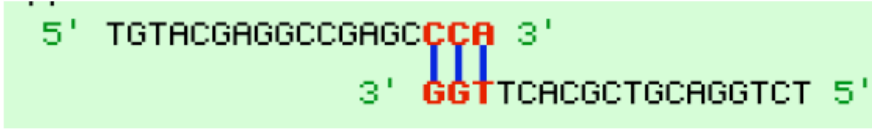
5. Dimer oluşturma

Primerlerde iki tip dimer oluşumu mümkündür. Birincisinde her bir primer yine kendisi ile dimer yapabilir (rneğin forward-forward dimeri, forward-reverse dimeri). Bu durum self-dimer ya da homo-dimer olarak adlandırılır. Primer iftlerindeki her primer için ayrı ayrı yapılmalıdır. İkinci durumda ise primer çiftindeki iki primer birbirleriyle dimer yapabilir (forward-reverse dimeri). Bu durum ise hetero-dimer olarak adlandırılır. Bu analiz ise her bir primer çifti için yapılmalıdır.

Oligonükleotid çiftleri dimer oluşumuna neden olacak şekilde birbirleri ile eşlenik olmamalı (homodimer veya heterodimerler oluşmamalı). Burada da yine yukarıda ΔG değeri ile ilgili bahsedilenler geçerli.

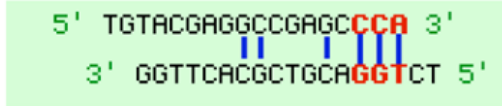
Oluşan primer dimerlerinde özellikle 3' uçlar dimer oluşturmuşsa bu daha istenmeyen bir durumdur. İdeal olan hiç oluşurmamasıdır. Yine eğer oluşan dimer A-T ler içeriyorsa, G-C içermesine göre daha tercih edilebilir olur. G-C içerirse özellikle 60 C altındaki T_m değerleri için sorun oluşturabilir.

Dimer oluşumlarını test etmek için de yine IDT OligoAnalyzer Tool kullanılabilir.



Yukarıdaki şekilde 3' uçlarından oluşan bir dimer görülüyor. Bu daha istenmeyen bir durumdur.

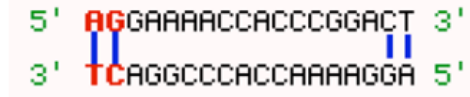
$$\Delta G = -5 \text{ kcal/mol}$$



$$\Delta G = -9.3 \text{ kcal/mol}$$



$$\Delta G = -1.6 \text{ kcal/mol}$$



Yukarıdaki 3 şekilden en uygun olan primer ΔG değeri -1.6 olmalıdır. -5 olan da çok iyi değil ama zorunda kalınırsa yine de kullanılabilir. -9.3 değere sahip olan durumda ise primerin kullanılması tavsiye edilmez.

6. Diğer hususlar

- Oligonükleotid dizilimlerinde için üçten fazla tekrar eden baz olmaması tercih edilir.
- Primerin 3' ucunda GC oranı yüksek olmamalıdır. (Ör: 5'-CAGTAACAGATACGGGCA > 3' ucunda GC oranı yüksek)
- Özellikle dizi analizi de yapılacaksa, PCR ile çoğaltılacak bölgenin yaklaşık 500 bç'yi geçmemesi tercih edilir. Daha uzun dizilimler için parçalayarak primer tasarımı yapmak gerekebilir. Bazı özel yöntemler ve enzimler kullanarak daha uzun dizileri PCR ile çoğaltmak da mümkündür.
- PCR primerlerinin yerleşimi esas olarak amplifiye edilmeye çalışılan DNA bölgesinin yukarısı ("upstream") ve aşağısı ("downstream") olmalıdır.

NOTLAR

Primer tasarlamının kesin bir şekilde belirlenmiş katı kuralları yoktur. Bazen kriterlere çok da iyi uymayan bir primer çifti PCR reaksiyonunda çok iyi çalışabilir. Bazen de kriterlere çok iyi uyan bir primer çifti çalışmayabilir. Ancak primer tasarımı yaparken bahsedilen hususlara dikkat edilmesi ve olabilecek en iyi primerin tasarlanması mutlaka zaman kaybını önleyecektir.

Derste uygulama olarak yapılan tasarlama, standart olarak kullanılan bir PCR reaksiyonu içindir. Bazı durumlarda farklı amaçlar için daha değişik primer tasarlama yaklaşımları benimsenebilir (ör: dejenere primer).

Primer tasarımında kullanılabilecek ücretli veya ücretsiz çeşitli yazılımlar ve internet siteleri mevcuttur. Uygulama örneği olarak ücretsiz olarak kullanılabilecek internet platformları seçilmiştir ancak sadece kullandıklarımızla sınırlı değildir.

Hazırladığınız ödevlerin ve derste uygulamarın amacının, en mükemmel primer çiftini tasarlamak değil, primer tasarlama kullanılabilecek programları ve nelere dikkat edilmesi gerektiğini öğrenmek olduğunu unutmayın. Bahsedilen kriterlere göre değerlendirerek, aynı yöntemle veya farklı programları kullanarak kendi çalışmalarınıza ait primerleri tasarlayabilirsiniz. Kullanılan program değişse de genel yaklaşım ve dikkat edilecek noktalar aynı olacaktır. Bu noktada çok daha seçici olarak ve tüm kriterleri bütün primer çifti alternatiflerinde değerlendirerek en uygun primer çiftini seçmelisiniz.